



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 59 690 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 12 N 15/88**

⑦1 Aktenzeichen: 199 59 690.5  
⑦2 Anmeldetag: 6. 12. 1999  
④3 Offenlegungstag: 8. 6. 2000

DE 199 59 690 A 1

⑥6 Innere Priorität:  
198 55 952. 6 04. 12. 1998

⑦1 Anmelder:  
Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin,  
13125 Berlin, DE

⑦4 Vertreter:  
Baumbach, F., Dr.rer.nat. Pat.-Ing., Pat.-Ass., 13125  
Berlin

⑦2 Erfinder:  
Zeisig, Reinhard, Dr., 10435 Berlin, DE; Walther,  
Wolfgang, Dr., 16341 Schwanebeck, DE

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑤4 Mittel zum nichtviralen Transfer von DNS in eukaryotische Zellen

⑤7 Die Erfindung betrifft ein Mittel zum Transfer von Fremd-DNS (Desoxyribonukleinsäure) in eukaryotische Zellen, seine Herstellung und Verwendung. Anwendungsgebiete der Erfindung sind die Medizin, Biologie, Landwirtschaft und die pharmazeutische Industrie. Ziel der Erfindung ist die Entwicklung eines Systems zum nichtviralen Transfer von DNS in eukaryotische Zellen auf der Basis einer Verbesserung des Transmembrantransportes des DNA-Komplexes in das Zytosol der Zelle. Die erfindungsgemäße Lösung dieser Aufgabe ist ein Mittel zum nichtviralen Transfer von DNS in eukaryotische Zellen, das in liposomaler Form vorliegt und aus Zellmembran-aktiven Alkylphospholipiden und weiteren amphiphilen Substanzen besteht.

DE 199 59 690 A 1

## Beschreibung

Für eine erfolgreiche Gentherapie ist eine effektive und sichere Einschleusung von Plasmiden, Antisense-Oligonucleotiden, Ribozymen oder anderer Nucleinsäuresequenzen in die jeweiligen Zielzellen eine wesentliche Voraussetzung. Zur Einschleusung dieser Partikel werden Vektoren verwendet. Virale Vektoren ergeben Sicherheitsprobleme, führen zu immunologischen Abwehrreaktionen, ihre Herstellung ist aufwendig. Vektoren auf der Grundlage von Lipiden haben die Nachteile einer oftmals unbefriedigenden Transfektionsrate (Lasic und Ruff, Medical Applications of Liposomes, Eds. Lasic u. Papahadjopoulos, Elsevier, 1998, 353-370; US 5,891,714; US 5,661,018; US 5,585,479; A 0092190; WO 9405624).

Alkylphospholipide (APL) sind biologisch aktive Lipide. Ihre Wirkung ist vornehmlich gegen die Zellmembran gerichtet, sie modifizieren die Rigidität der Zellmembran, beeinflussen deren Phospholipidmetabolismus und interferieren mit membranständigen Kinasen (Alkyl-phosphocholines: An update, Drugs of Today, Vol. 34, Suppl. F, 1998).

Ziel der Erfindung ist die Entwicklung eines Systems zum nichtviralen Transfer von DNS in eukaryotische Zellen auf der Basis von Verbindungen, die den Transmembrantransport des DNS-Komplexes in die Zelle begünstigen und damit eine hohe Transfektionseffizienz bewirken.

Die Lösung dieser Aufgabe ist ein Mittel zum nichtviralen Transfer von DNS in eukaryotische Zellen, das in liposomaler Form vorliegt und aus Zellmembran-aktiven Alkylphospholipiden und weiteren amphiphilen Substanzen besteht. Das Mittel wird gemäß Anspruch 1 realisiert, die Unteransprüche sind Vorzugsvarianten.

Im einzelnen ist das erfindungsgemäße Mittel durch folgende Zusammensetzung charakterisiert:

- ein Alkylphospholipid (APL)
- ein weiteres Lipid mit vorzugsweise positiver Ladung
- ein DNS-Vektorkonstrukt
- ggf. Dioleylphosphoethanolamin (DOPE)
- ggf. Cholesterol (CH)
- ggf. weitere in der Liposomenherstellung übliche Hilfs- und Zusatzstoffe, wie Puffer und Antioxydantien.

Das erfindungsgemäße Mittel zum Gentransfer ist in seiner Transfektionseffizienz bis zu 300% wirksamer im Vergleich zum allgemein verwendeten liposomalen Transfektionsreagenz Lipofektin, wobei die Toxizität gegen die Zielzellen verringert ist und dieses Mittel aus pharmazeutisch geprüften Bestandteilen herstellbar ist.

## Beispiele

## Beispiel 1

0,076 mg Tetradecylphosphocholin (TPC, 0,2 µmol); 2,52 mg Dioctadecyl-dimethylamin (DDAB, 4 µmol) und 0,74 mg Dioleylphosphoethanolamin (DOPE, 1 µmol) werden in 5 ml Chloroform/Methanol (7/3; v/v) gelöst, und dann das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer vollständig abgedampft. Der erhaltene, fein verteilte Lipidfilm wird mit 1 ml einer 5%igen Suchroselösung resuspendiert, nach Zugabe von einigen Glasperlen mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur auf der Schüttelmaschine intensiv bewegt. Es werden multischichtige Vesikel (MLV) erhalten, die direkt für die Lipoplexbildung eingesetzt werden können. Die Liposomensuspension ist in ihrer Größenzusammensetzung

heterogen mit Liposomendurchmesser bis 1 µm und einem Polydispersitätsindex (PI) von bis zu 0,9 (Dynamische Lichtstreuungsmessung, DLS).

Eine homogene Liposomenpopulation mit kleinen Durchmessern (LUV) wird erhalten, wenn die MLV durch Polycarbonatfilter, Porendurchmesser 200 nm mit einem Liposom-Fast Basis-System (Avestin, Inc. Ottawa, Canada) 19x mal extrudiert werden. Es wird eine unimodale Größenverteilung um 200 nm mit einem Polydispersitätsindex kleiner 0,3 bei der DLS erhalten.

Der Gehalt an Lipid wird mittels HPTLC kontrolliert und es werden etwa 90% der Ausgangsmenge erhalten.

## Beispiel 2

Eine Lösung von 0,41 mg Hexadecylphosphocholin (HPC, 1 µmol); 0,387 mg Cholesterol (CH, 1 µmol), 1,26 mg DDAB, (2 µmol) und 0,74 mg DOPE (1 µmol) in Chloroform/Methanol (5 ml; 7/3; v/v) wird entsprechend Beispiel 1 zu MLV-Herstellung verwendet. Die MLV werden dann gegebenenfalls weiter zu kleinen Vesikeln (LUV) extrudiert. Die so erhaltenen Liposomen werden für die Lipoplexbildung eingesetzt.

## Beispiel 3

Liposomen werden entsprechend Beispiel 1 aus 0,076 mg TPC (0,2 µmol), 0,193 mg CH (0,5 µmol), 2,52 mg DDAB (4 µmol) und 0,74 mg DOPE (1 µmol) hergestellt und als MLV oder LUV für die Lipoplexbildung eingesetzt.

## Beispiel 4

Liposomen werden entsprechend Beispiel 1 aus 0,076 mg TPC (1 µmol), 0,39 mg Cholesterol (CH, 1 µmol), 2,52 mg DDAB (4 µmol) und 0,74 mg Dioleylphosphoethanolamin (DOPE, 1 µmol) hergestellt und als MLV oder LUV für die Lipoplexbildung eingesetzt.

## Beispiel 5

Liposomen werden entsprechend Beispiel 1 aus 0,076 mg TPC (0,2 µmol), 0,38 mg Cholesterol (CH, 1 µmol), 1,26 mg DDAB, (2 µmol) und 0,74 mg DOPE (1 µmol) hergestellt und als MLV oder LUV für die Lipoplexbildung eingesetzt.

## Beispiel 6

Liposomen werden entsprechend Beispiel 1 aus 0,092 mg Octadecyl-(N,N-dimethylpiperidin-4-yl)-phosphat (OPP, 1 µmol), 1,89 mg DDAB, (3 µmol) und 0,74 mg DOPE (1 µmol) hergestellt und als MLV oder SUV für die Lipoplexbildung eingesetzt.

## Beispiel 7

Liposomen werden entsprechend Beispiel 1 aus 0,076 mg TPC (0,2 µmol), 0,193 mg Cholesterol (CH, 0,5 µmol), 2,52 mg DDAB, (4 µmol) und 0,74 mg N-[1-(2,3-Dioleloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat (DOTAP; 1 µmol) hergestellt und als MLV oder SUV für die Lipoplexbildung eingesetzt.

## Beispiel 8

Liposomen werden entsprechend Beispiel 1 aus 0,435 mg Octadecylphosphocholin (OePC, 1 µmol), 1,89 mg

DDAB (3 µmol) und 0,744 mg DOPE (1 µmol) hergestellt und als MLV oder SUV für die Lipoplexbildung eingesetzt.

#### Beispiel 9

Liposomen werden entsprechend Beispiel 1 aus 0,41 mg HPC (1 µmol), 0,38 mg Cholesterol (CH, 1 µmol), 2,23 mg DOTAP (3 µmol) und 0,74 mg DOPE (1 µmol) hergestellt und als MLV oder SUV für die Lipoplexbildung eingesetzt.

#### Beispiel 10

Liposomen werden entsprechend Beispiel 5 aus 0,38 mg TPC (1 µmol), 0,39 mg Cholesterol (CH, 1 µmol), 1,26 mg DDAB, (2 µmol), 0,74 mg DOPE (1 µmol) und zusätzlich noch mit 1,38 mg N-(O-methyl-polyethylenglycyl)-1,2-distearyl-s,n-glycero-3-phosphoethanolamin (PEG<sub>2000</sub>DSPE; 0,5 µmol) hergestellt und als MLV oder SUV für die Lipoplexbildung eingesetzt.

#### Beispiel 11

Lipoplexe werden aus den Liposomen der Beispiel 1-10 und dem genetischen Material wie folgt erhalten: die Liposomen werden mit Dulbeccos MEM Medium ohne Serum so verdünnt, daß in 190 µl Medium zwischen 2,5- 0,5 µg Gesamtlipid enthalten sind. Das Plasmid pSV40 β-Gal, welches als Reportergen β-Galaktosidase trägt, wird ebenfalls verdünnt, so daß Konzentrationen von 2 bis 0,06 µg/10 µl erhalten werden. Diese 10 µl Plasmidlösungen werden zu den Liposomenverdünnungen gegeben, kurz geschüttelt und für 45 Minuten zur Ausreifung bei Raumtemperatur stehen gelassen.

#### Beispiel 12

Zur Transfektion mit den im Beispiel 11 beschriebenen Lipoplexen werden Tumorzellen (z. B. die humanen Kolonkarzinom-Zelllinien HCT 116 (Brattain, M. G., et. al. Cancer Res. 41 (1981): 1751-1756) and HCT 15 (Iwahashi, T., et. al. 1991: 11 (1991): 1309-1312) eingesetzt. Die Zellen werden in einer Dichte von  $2 \times 10^4$  Zellen/well in eine Microtiterplatte eingesät und über Nacht zum Anheften bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert. Dann werden die Zellen mit serumfreien DMEM gewaschen und danach jeweils 200 µl der Lipoplex-Lösungen mit den individuellen Kombinationen zwischen kationischem Liposom (2,5-0,5 µg) und Plasmid (2-0,06 mg) in jeweils 3 wells pipettiert.

Nach 4 Stunden werden 100 µl Medium mit 30% fötalem Kälberserum zugeben, um die Zellen für weitere 44 Stunden unter Normalbedingungen wachsen zu lassen.

Nach dieser Zeit wird der Überstand von den Zellen entfernt und 200 µl einer Lösung von o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG; 1 mg/ml; Lim, K. and Chae, CB, Biotechniques 7: 576-579; ) zu jedem well gegeben. Als Maß der Transfektionswirksamkeit wird die Aktivität der β-Galaktosidase anhand der gebildeten Menge an Nitrophenylderivat mit einem Photospektrometer bei 405 nm zu verschiedenen Zeitpunkten während der folgenden 6 Stunden gemessen. Die gemessene optische Dichte wird mit einem Kontrollwert, der mit Kontroll-Lipoplexen aus Lipofektin (2 µg/well) und dem pSV40 β-Gal Plasmid, (1 µg je well) unter gleichen Bedingungen auf der gleichen Platte erhalten wurde, korreliert. Es werden Transfektionssteigerungen von bis zu 300% im Vergleich zu Lipofektin in Abhängigkeit von der Liposomenzusammensetzung, der Mischung zwischen Liposom und Plasmid und von der Zelllinie erhalten,

die für die Beispiele 1-5 im Bild 1 dargestellt sind.

#### Patentansprüche

1. Mittel zum Transfer von DNS in eukaryotische Zellen auf Liposomenbasis enthaltend:

- ein Alkylphospholipid (APL)
- ein weiteres Lipid mit vorzugsweise positiver Ladung
- ein DNS-Vektorkonstrukt
- ggf. Dioleylphosphoethanolamin (DOPE)
- ggf. Cholesterol (CH)
- weitere in der Liposomenherstellung übliche Hilfs- und Zusatzstoffe, wie Puffer und Antioxidantien.

2. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Alkylphospholipid Verbindungen der allgemeinen Struktur I eingesetzt werden, Struktur I:

R-Y-P-X

wobei bedeuten:

R: einen Alkyl-, Alkenyl-, oder Alkinyrest mit 12 bis 22 C-Atomen

Y: Sauerstoff, Schwefel oder CH<sub>2</sub>

P: Phosphat (PO<sub>2</sub>)

X: Cholin-, Serin- oder Ethanolaminreste, bzw. von ihnen abgeleitete Derivate,

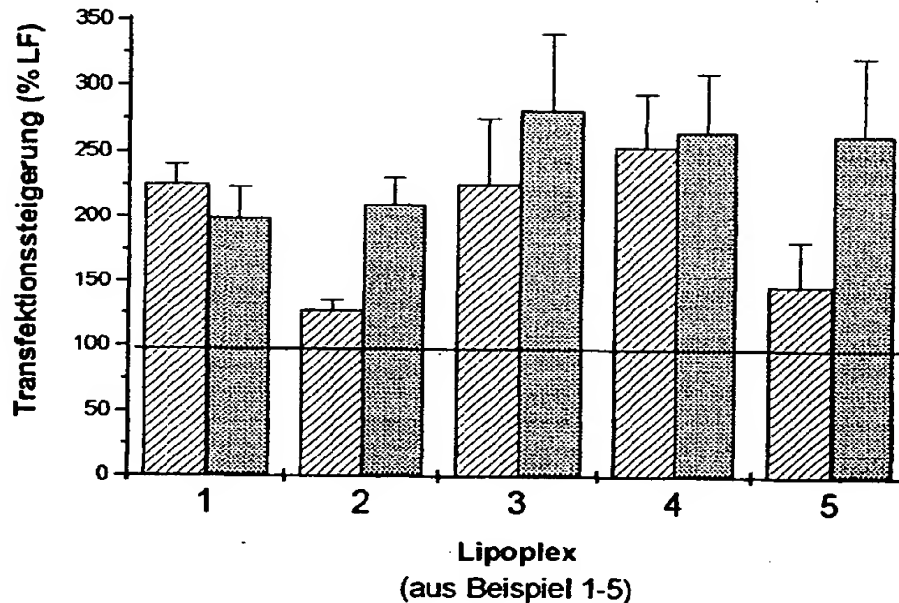
bevorzugt Tetradecylphosphocholin, Hexadecylphosphocholin, Octadecylphosphocholin, Erucylphosphocholin, sowie die entsprechenden Serine und Phosphoethanolamine, insbesondere Octadecyl-(N,N dimethylpiperidino-4yl)phosphat (OPP) und seine Abkömmlinge.

3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als Lipide mit positiver Ladung (kationische Lipide) N-[1-(1,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniumsulfat, (DOTAP), Dioctadecyl-dimethylamin Monobromid (DDAB), 1,3-Dioleoyloxy-2-(6-carboxy-spermyl)-propylamid (DOSPA) oder andere analoge Verbindungen eingesetzt werden.

4. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Verhältnis APL: (Kationisches) Lipid: DOPE: CH 0,1-1 : 0,2-4 : 0,0-4 : 0-3 beträgt.

5. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewichtsverhältnis von Gesamtlipid zu Fremd-DNS 1-10 : 1 beträgt.

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

**Bild 1:****Transfektion von Kolonkarzinomzellen mit Lipoplexen aus Alkylphospholipid-Liposomen und dem Plasmid pSVB-Gal**

Die Lipoplexe 1-5 wurden aus LUV und dem Plasmid wie im Beispiel 11 beschrieben hergestellt und entsprechend Beispiel 12 mit den Zellen für 48 Stunden inkubiert. Angegeben sind die Transfektionssteigerungen im Vergleich zum als Kontrolle mitgeführten Lipofektin-Komplex auf der Basis der jeweils besten erreichten Werte. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens 3 individuellen Experimenten, die jeweils als 3-fach-Bestimmung ausgeführt wurden.

Schraffierte Balken: HCT 116 Kolonkarzinomzellen

Graue Balken HCT 15 Kolonkarzinomzellen

Die durchgehende waagerechte Linie verdeutlicht den 100% Basiswert, der unter optimalen Bedingungen mit Lipofektin-Lipoplexen erhalten wird.